製品コード RR047A

研究用

TaKaRa

PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)

説明書

v201102Da

遺伝子の発現解析を正確に行うためには cDNA のみを検出する必要があります。イントロン前後のエキソン上にプライマーを設計することで、多くの場合ゲノム DNA を鋳型とした増幅を避けることができます。しかし、シングルエキソンの遺伝子や大きなイントロンがない遺伝子など適切なプライマーが設計できない、あるいは偽遺伝子の存在、非特異的増幅等によりゲノム DNA からの増幅が避けられない場合もあります。RNA サンプルをあらかじめ DNase I 処理する方法もありますが、DNase I を失活、除去するための煩雑な操作が必要となり、RNA の分解やロスを招くことがあります。
PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser は、ゲノム DNA 除去反応をプラスしたリアルタイム RT-PCR 専用の逆転写キットです。強力な DNA 分解活性を有する gDNA Eraser によりゲノム DNA のみを 42℃ 2 分の処理で除去した後、DNA 分解活性を完全に抑制する成分を含む逆転写用反応試薬を添加し、15 分間逆転写反応を行います。20 分未満の迅速な反応で、ロスのない RNA からの cDNA 合成が達成できます。
本製品を用いて得られた cDNA は、SYBR® Green アッセイ、TaqMan® プローブアッセイのどちらにも利用できます。目的に応じて SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)、*Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) など Perfect Real Time シリーズの定量 PCR 試薬と組み合わせてご使用ください。

I. キットの内容（20 μl 反応系、100 回）

1.	gDNA Eraser	100 μl
2.	5 × gDNA Eraser Buffer ＊1	200 μl
3.	PrimeScript® RT Enzyme Mix I ＊2	100 μl
4.	5 × PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time) ＊3	400 μl
5.	RT Primer Mix ＊4	400 μl
6.	RNase Free dH_2O	1 ml × 2 本
7.	EASY Dilution (for Real Time PCR) ＊5	1 ml

＊1：5 × gDNA Eraser Buffer 成分がその後の逆転写反応に必要なため、ゲノム DNA 除去反応は必ず行ってください。
＊2：RNase inhibitor を含む。
＊3：dNTP mixture を含む。
＊4：Oligo dT Primer と Random 6mers を含む。
＊5：total RNA や cDNA を段階希釈するための希釈溶液として使用します。水や TE で希釈すると正確な希釈ができない場合がありますが、この EASY Dilution を用いると低濃度までの正確な希釈ができます。なお、このバッファーが逆転写や PCR の反応性に影響をおよぼすことはありません。希釈した鋳型溶液をそのまま逆転写反応や PCR 反応の鋳型として使用できます。
単品でも購入できます。EASY Dilution（for Real Time PCR）（製品コード 9160）
注） EASY Dilution は、タカラバイオのリアルタイム PCR 試薬と組み合わせてご使用ください。他社メーカーの製品については適合性を確認していません。

キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）
- サーマルサイクラー
  （または 37℃、42℃ 恒温槽、85℃ ヒートブロック）
- 0.2 ml および 1.5 ml マイクロチューブ（逆転写反応用）
- マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

II. 保存　　－ 20℃

III. 特長

（1） ゲノム DNA の除去を gDNA Eraser によるわずか 2 分の反応で実現します。

（2） 15 分の反応で効率良くリアルタイム PCR 用の鋳型 cDNA を合成できます。2 ステップのリアルタイム RT-PCR に最適です。

（3） 逆転写用のプライマーとして Random 6 mers と Oligo dT Primer を混合した RT Primer Mix を使用しており、RNA の全領域を均一に合成できます。

（4） SYBR® Green アッセイ用と TaqMan® プローブアッセイ用のプロトコールを用意しています。リアルタイム PCR 時のアッセイ方法にあわせて選択してください。

> SYBR® Green アッセイ用プロトコールと TaqMan® プローブアッセイ用プロトコールでは以下の点が異なります。
> ・逆転写反応に用いる RT Primer Mix の量
> ・逆転写反応に使用できる total RNA の量

（5） リアルタイム RT-PCR による定量には検量線の作成が必須です。適切な検量線の作成には、total RNA や逆転写後の cDNA を低濃度まで正確に希釈することが重要ですが、水や TE で希釈すると特に低濃度の希釈が不安定となり、利用できる検量線のレンジが狭くなる場合があります。製品添付の EASY Dilution（for Real Time PCR）を希釈に用いることで低濃度まで正確に希釈でき、幅広いレンジで検量線の作成が行えます。

IV. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1） 反応液は、数回～ 10 回分程度の Master Mix（RNase Free dH_2O、バッファー、酵素等の混液）をまとめて調製すると便利です。Master Mix を作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、撹拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。

（2） gDNA Eraser および PrimeScript® RT Enzyme Mix I は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50% グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。

（3） 5 × gDNA Eraser Buffer および 5×PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time) は使用前によく vortex をした後、軽く遠心してから使用してください。

（4） 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

V. 操作：逆転写反応

1. ゲノム DNA 除去反応

下記に示すゲノム DNA 除去反応液を氷上で調製する。
RNA サンプル以外のコンポーネントを必要本数＋ α 分調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

＜1 反応あたり＞

5 × gDNA Eraser Buffer	2.0 μl
gDNA Eraser	1.0 μl
total RNA	＊1
RNase Free dH_2O	
Total	10.0 μl

↓

42℃、2 min（もしくは室温 5 min ＊2）
4℃

＊1：次ステップの 20 μl 逆転写反応系で逆転写できるのは、SYBR® Green Assay の場合はおおよそ 1 μg までの total RNA、TaqMan® Probe Assay の場合はおおよそ 2 μg までの total RNA です。

＊2：室温での反応の場合、30 分程度放置しても問題ありません。

2. 逆転写反応

下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。
1 . の反応液以外のコンポーネントを必要本数＋ α 分、Master mix として調製し、1 . の反応液に 10 μl ずつ添加する。＊3
直ちに反応液を軽く攪拌して均一にした後、逆転写反応を行う。

【SYBR® Green Assay の場合】

1 . の反応液	10.0 μl	
5 × PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time)	4.0 μl	Master mix 10 μl
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	1.0 μl	
RT Primer Mix ＊4	1.0 μl	
RNase Free dH_2O	4.0 μl	
Total	20.0 μl ＊5	

↓

37℃、15 min ＊6
85℃、5 sec
4℃＊7

【TaqMan® Probe Assay の場合】

1. の反応液	10.0 μl	
5 × PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time)	4.0 μl	Master mix 10 μl
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	1.0 μl	
RT Primer Mix ＊4	4.0 μl	
RNase Free dH_2O	1.0 μl	
Total	20.0 μl ＊5	

↓

37℃、15 min ＊6

85℃、5 sec

4℃＊7

＊3：Master mix を調製せず、1. の反応液に個々の試薬を加えて逆転写反応液を調製する場合は、まず RNase Free dH_2O と 5×PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time) を添加・混合して gDNA Eraser の活性を完全に抑制した後、RT Primer Mix、PrimeScript® RT Enzyme Mix I を添加してください。さらに反応液を軽く攪拌して均一にした後、逆転写反応を開始します。

＊4：RT Primer Mix を用いると、mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されますが、別途ご用意された Oligo dT primer や Gene Specific Primer を用いることも可能です。それぞれの場合の使用量は以下の通りです。

Oligo dT primer	50 pmol ／ 20 μl 反応系
Gene Specific Primer	5 pmol ／ 20 μl 反応系

＊5：逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。

＊6：Gene Specific Primer を用いる場合、逆転写反応を 42℃、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

＊7：cDNA 合成産物を長期保存する時は、－ 20℃以下で保存してください。

（注） 逆転写反応液をリアルタイム PCR に持ち込む時には、PCR 反応液容量の 10% 以下にしてください。

VI. 備考：リアルタイム PCR

本キットで逆転写反応を行った後、SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820A/B）を用いてリアルタイム PCR を行う場合のプロトコール例を示します。
リアルタイム PCR を TaqMan® プローブ検出で行う場合には *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time)（製品コード RR039A/B）をご使用ください。

＜ Thermal Cycler Dice® Real Time System を用いる場合の操作方法＞

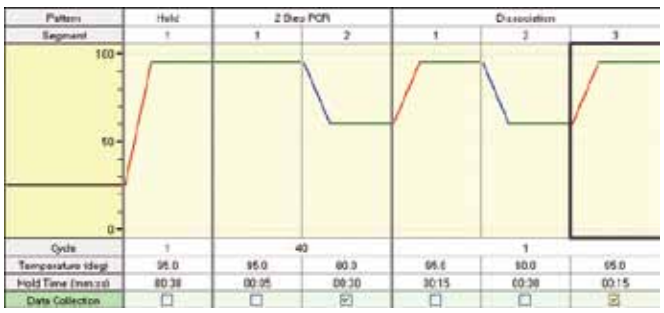
1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（2×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	1 μl	0.4 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	1 μl	0.4 μM ＊1
RT 反応液（cDNA 溶液）	2 μl	＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.5 μl	
Total	25 μl	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。
＊ 2：total RNA 10 pg ～ 100 ng 相当量の cDNA を template として使用することが望ましい。また、逆転写反応液の持込みは、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 step PCR を行います。

〔シャトル PCR 標準プロトコール〕



Hold（初期変性）
Cycle：1
95℃　30 秒

2 Step PCR
Cycle：40
95℃　5 秒
60℃　30 ～ 60 秒

Dissociation

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq*® HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、解析を行う。
反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。＊
＊：解析方法の詳細は、Thermal Cycler Dice® Real Time System 取扱説明書を参照してください。

＜ Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法＞
※ 各機種の取扱説明書（Life Technologies 社）に従って操作してください。

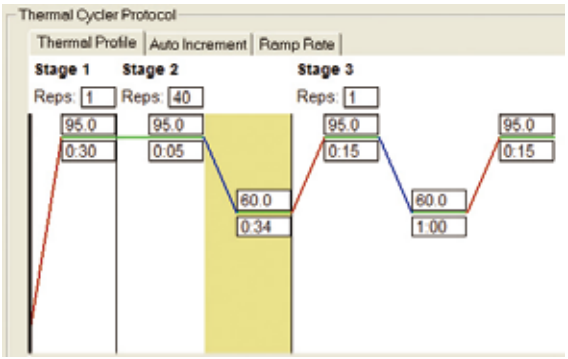
1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（2×）	10 μl	25 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.8 μl	2 μl	0.4 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.8 μl	2 μl	0.4 μM ＊1
ROX Reference Dye or Dye II（50×） ＊3	0.4 μl	1 μl	1 ×
RT 反応液（cDNA 溶液）	2 μl	4 μl	＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	6 μl	16 μl	
Total	20 μl ＊4	50 μl ＊4	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。
＊ 2：20 μl 反応液あたり total RNA 10 pg ～ 100 ng 相当量の cDNA を template として使用することが望ましい。また、逆転写反応液の持込みは、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。
＊ 3：ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されています。7500 Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II（50 ×）の使用を推奨します。
なお、7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye（50×）を使用してください。
＊ 4：各装置の推奨容量に従って調製する。

2. 反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 step PCR を行います。

〔シャトル PCR 標準プロトコール〕



Stage 1：初期変性
Reps：1
95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
Reps：40
95℃　5 秒
60℃　31 秒、34 秒＊

Dissociation Stage

＊：7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定する。

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq*® HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、解析を行う。
反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。＊
＊：解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

VII. Appendix

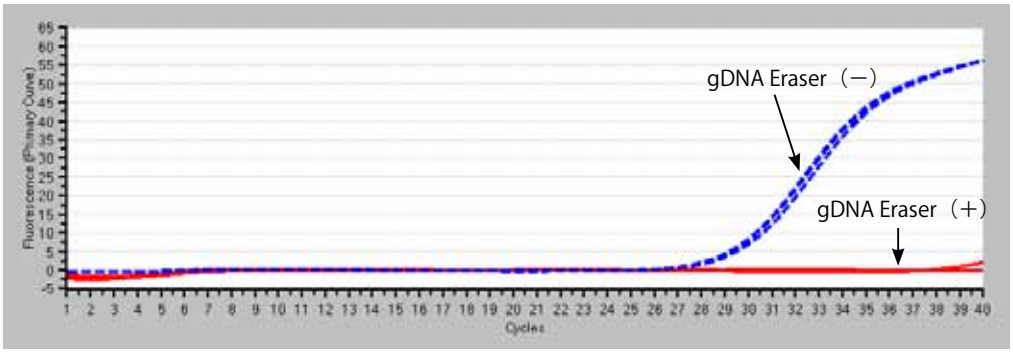
A. 実験例：total RNA 中の混入ゲノム DNA 除去効果の検証

【方法】
自家調製した Mouse Liver 由来 total RNA 2 μg を用いて gDNA Eraser 添加（＋）／無添加（－）でゲノム DNA 除去反応を行った後、逆転写反応を RTase 非存在下で行うことによって、total RNA 中に含まれるゲノム DNA の残存量を確認した。
反応は各 3 連で行った。

リアルタイム PCR
試薬：　SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time)　(製品コード RR041A)
鋳型：　上記の逆転写反応液　各 2 μl
反応液量：　25 μl
検出遺伝子：　Mouse *Rsp18*
プライマー：　Perfect Real Time サポートシステムのプライマーを使用
（イントロンサイズ：102 bp）
反応条件：　Thermal Cycler Dice® Real Time System 標準プロトコール

【結果】

増幅曲線

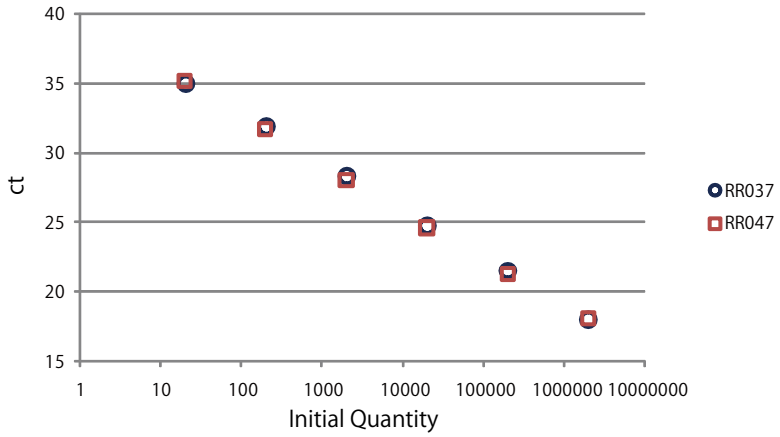


gDNA Eraser（＋）：実線
gDNA Eraser（－）：点線

B. 実験例：cDNA 合成量の比較

逆転写反応
試薬：　RR047A；PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)
　　RR037A；PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real time)
鋳型：　Mouse Liver 由来 total RNA 2 pg ～ 2 μg および滅菌水
反応液量：　20 μl
プライマー：RT Primer Mix
反応条件：　各キットの推奨条件

リアルタイム PCR
試薬：　SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time)（製品コード RR041A）
鋳型：　上記逆転写反応液　各 2 μl
反応液量：　25 μl
検出遺伝子：Mouse *Rsp18*
プライマー：Perfect Real Time サポートシステムのプライマーを使用
反応条件：　Thermal Cycler Dice® Real Time System の標準プロトコール



RR037A；PrimeScript® RT reagent Kit（○）
RR047A；PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser　（□）

Reagent	R2	増幅効率（%）	Standard Curve
RR037A	1.000	95.9	Y = − 3.425 × LOG(X) + 43.05
RR047A	0.999	95.7	Y = − 3.429 × LOG(X) + 42.94

C. RNA サンプルの調製について

純度の高い RNA サンプルを得るためには、細胞内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理の（1）あるいは（2）を行ってから使用してください。

（1） 乾熱滅菌（180℃、60 分）

（2） ガラス器具を 0.1% ジエチルピロカーボネート（DEPC）溶液で、37℃、12 時間処理する。残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理（120℃、30 分）する。

RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

【溶液】

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌（180℃、60 分）あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる蒸留水はあらかじめ 0.1%DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

【RNA サンプルの調製法】

RT-PCR 法に用いる RNA サンプルは、通常少量の RNA があればよい場合が多いので簡便な精製法が用いられることもありますが、できれば GTC 法（グアニジンチオシアネート法）等で高純度に精製した RNA を用いることをお勧めします。

RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）や NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.20/.50/.250）などの市販の RNA 抽出キットを用いて、短時間で高純度の total RNA を調製することもできます。

RNA サンプルは、最終的に滅菌蒸留水または TE Buffer 溶液となるように調製してください。

VIII. 関連製品

PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)（製品コード RR071A/B）
SYBR® Premix DimerEraser® (Perfect Real Time)（製品コード RR091A/B）
Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)（製品コード RR039A/B）
EASY Dilution (for Real Time PCR)（製品コード 9160）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）
NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.20/.50/.250）
RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）
Perfect Real Time サポートシステム＊

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです。ご注文によりカスタム合成してお届けします。本製品および SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) または SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) と組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
http://www.takara-bio.co.jp/realtime/

IX. 参考文献

1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ、120-126
2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39-43

X. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

SYBR は Molecular Probe Inc. の登録商標です。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[M78] gDNA Eraser
This product is the subject of the pending JP patent application.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201102Da